

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07D499/64

G01N 33/532



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02127338.3

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1223596C

[22] 申请日 2002.8.2 [21] 申请号 02127338.3

[30] 优先权

[32] 2001. 8. 2 [33] EP [31] 01202941.9

[71] 专利权人 兰多克斯实验室有限公司

地址 英国北爱尔兰

[72] 发明人 罗伯特·I·麦康奈尔

埃尔·O·本奇克

斯蒂芬·P·菲茨杰拉德

约翰·V·拉蒙特

审查员 周 航

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 贾静环 宋 莉

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 3 页

[54] 发明名称 用于检测和定量  $\beta$  - 内酰胺青霉素的方法和试剂盒

[57] 摘要

本发明提供包括 6 - [D -  $\alpha$  - 氨基乙酰氨基] 青霉素衍生物的半抗原，所述青霉素衍生物在  $\alpha$  - 氨基上与取代或未取代的苯基二醛交联。另外，本发明提供包括与赋予抗原性的载体物质结合的前述半抗原的免疫原，包括与标记物结合的前述半抗原的偶联物，以及抗前述免疫原的抗体，该抗体能与完整的  $\beta$  - 内酰胺环中的至少一种结构性抗原决定部位结合。本发明还提供用于检测或定量样品中  $\beta$  - 内酰胺抗生素的方法和试剂盒，以及前述偶联物和前述抗体在检测或定量  $\beta$  - 内酰胺抗生素中的用途。本发明对主要的第一代  $\beta$  - 内酰胺具有广谱特异性，并可用于检测奶和肉等中残留的  $\beta$  - 内酰胺抗生素的存在。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 包括 6-[D- $\alpha$ -氨基乙酰氨基]青霉素衍生物的半抗原，所述青霉素衍生物在  $\alpha$ -氨基上与取代或未取代的苯基二醛交联，其中苯基二醛选自取代或未取代的邻苯二醛、取代或未取代的间苯二醛和取代或未取代的对苯二醛。  
5
2. 如权利要求 1 的半抗原，其中苯基二醛为取代或未取代的对苯二醛。
3. 如权利要求 2 的半抗原，其中苯基二醛为未取代的对苯二醛。
4. 制备如权利要求 1 至 3 中任一项的半抗原的方法，其中取代或未取代的苯基二醛在选自二甲基甲酰胺和二甲基亚砷的溶剂中与 6-[D- $\alpha$ -氨基乙酰氨基]青霉素衍生物反应。  
10
5. 包括如权利要求 1 至 3 中任一项的半抗原的免疫原，其中半抗原与赋予抗原性的载体物质结合。
6. 如权利要求 5 的免疫原，其中载体物质为蛋白质、蛋白质片段、合成多肽或半合成多肽。  
15
7. 抗如权利要求 5 或 6 的免疫原的抗体，其中抗体能与完整的  $\beta$ -内酰胺环中的至少一种结构性抗原决定部位结合。
8. 如权利要求 7 的抗体，其中抗体固定在支持底物上。
9. 制备如权利要求 7 或 8 中的抗体的方法，该方法包括将如权利要求 5 或 6 的免疫原重复给予动物而使动物免疫，以及从免疫动物中收集所得到的血清抗体。  
20
10. 如权利要求 9 的方法，其中该方法还包括将所述血清抗体固定和支持底物上。
11. 包括如权利要求 1 至 3 中任一项的半抗原与可检测到的标记物共价结合的偶联物。  
25
12. 如权利要求 11 的偶联物，其中标记物选自酶；发光物质；放射性物质；或它们的混合物。
13. 如权利要求 12 的偶联物，其中酶为过氧化物酶。
14. 如权利要求 12 的偶联物，其中发光物质选自生物发光、化学发光或荧光物质。  
30

15. 用于检测和定量样品中的 $\beta$ -内酰胺青霉素的方法，该方法包括将样品与如权利要求 11 至 14 中任一项的偶联物或其混合物和与如权利要求 7 或 8 的抗体或其混合物接触；检测或定量结合的偶联物；以及从校准曲线中推出样品中 $\beta$ -内酰胺青霉素的存在或含量。
- 5      16. 用于检测和定量 $\beta$ -内酰胺青霉素的试剂盒，该试剂盒包括如权利要求 11 至 14 中任一项的偶联物或其混合物，以及如权利要求 7 或 8 的抗体或其混合物。

用于检测和定量 $\beta$ -内酰胺青霉素的半抗原及其方法和试剂盒

5

## 发明背景

本发明涉及用于检测和定量 $\beta$ -内酰胺青霉素的方法和试剂盒,以及其中使用的半抗原、免疫原、偶联物(conjugate)和抗体。

其中“检测”是指定性分析物质是否存在。

10

其中“测定”是指对物质进行定量分析。

本发明希望对于主要的第一代 $\beta$ -内酰胺青霉素如氨苄青霉素(ampicillin)、青霉素G、羟氨苄青霉素(amoxycillin)、邻氯青霉素(cloxacillin)、双氯青霉素(dicloxacillin)和苯唑青霉素(oxacillin)具有广谱的适用性,但也并不限于这些特定的 $\beta$ -内酰胺青霉素。

15

出于预防和治疗的双重目的,而通常在畜牧业中使用抗生素。 $\beta$ -内酰胺类抗生素作为生长增强剂一般用于肉和乳品工业。这类抗生素,也被称为青霉素,通常被用来治疗奶牛的乳腺炎,以此提高牛奶产量和牛的产奶期。 $\beta$ -内酰胺也可添加在用于促进家禽和猪生长的动物饲料中。抗生素的使用,通过预防这类动物中的疾病或抑制肠中天然菌群的活性,使得动物生长到适销大小的速度比不使用这类生长增强剂的动物快。

20

然而,当 $\beta$ -内酰胺残留在肉和乳制品中时,会带来相关的问题。与接触任何抗生素一样,人连续接触 $\beta$ -内酰胺可导致用于治病的药物的效力降低,这是因为致病菌形成了耐药菌株。消费食品中存留的 $\beta$ -内酰胺也能导致青霉素敏感人群的过敏反应。含有这类抗生素的乳制品也会干扰加工过程中所用的细菌培养物。

25

因此,在整个欧洲共同体(European Community)推行了严格的准则,这些准则规定了在奶和肉中停用 $\beta$ -内酰胺的时间以及最高推荐浓度(MRLs)。对奶和肉样品进行常规检测,以确保其遵守该EC法规。采用各种方法来检测如 $\beta$ -内酰胺的抗生素。这些检测多数是基于微生物抑制检测,这种检测耗时并仅对个别 $\beta$ -内酰胺具有特异性。因此,有必要开发出一种用于快速

30

检测奶和肉品中 $\beta$ -内酰胺的方法,如果该方法通用,即可检测大多数(如果不是全部时) $\beta$ -内酰胺抗生素,则将特别有价值。

已进行了许多努力,尝试着在 $\beta$ -内酰胺致敏的动物中生成(raise)抗体,目的是建立用于检测 $\beta$ -内酰胺的一般的免疫分析法(immunoassay)。这种方法的第一阶段是产生可在动物宿主中诱发免疫应答的免疫原。但这也存在  
5 问题,因为 $\beta$ -内酰胺环在与载体蛋白质偶联的过程中不能保持完整。已知的可在开放的 $\beta$ -内酰胺环上进行偶联的方法参见 US 4,347,312A、US 5,128,240A、de Haan 等(1985 年)和 Faghihi Shirazi 等(1991 年)中的描述。这可以产生对开放形式的 $\beta$ -内酰胺环敏感的抗血清,但是不一定对一般的环  
10 结构敏感。

另外,例如也可对闭合的 $\beta$ -内酰胺环上的游离羧基进行酯化,参见 EP 309299-A 和 Usleber 等(1994 年)中的描述。对以这种方式偶联的 $\beta$ -内酰胺  
抗生素而生成的抗血清,仅对酰基侧链特异并且仅与具有类似侧链的其他  
 $\beta$ -内酰胺抗生素发生交叉反应,例如异恶唑基青霉素。另外,也可通过 6-  
15 氨基青霉烷酸上的 6-氨基进行偶联,例如 EP 309299A 和 de Leuw 等(1997  
年)中的描述。在这种情况下, $\beta$ -内酰胺环在偶联过程中可以保持完整,此时抗体与主要的第一代 $\beta$ -内酰胺有高度的交叉反应性。 $\beta$ -内酰胺青霉素上的  
其它潜在偶联位置是青霉素的 D- $\alpha$ -氨基乙酰氨基上的 $\alpha$ -氨基,例如  
Nagakura 等(1991 年)所描述的。Nagakura 等(1991 年)披露的细胞系, Abp4  
20 和 Abp7,涉及半抗原和采用 MBS(马来酰亚胺基苯甲酰-N-羧基琥珀酰亚胺)  
交联剂的偶联物,该文献推断其中一个细胞系(Abp4)可识别噻唑烷环,而另  
一细胞系(Abp7)可识别酰基侧链。Abp4 与青霉素 G、6-氨基青霉烷酸和某  
些头孢菌素发生交叉反应,而 Abp7 是高度特异性的,它与第一代 $\beta$ -内酰  
胺的交叉反应性很小或没有反应性。

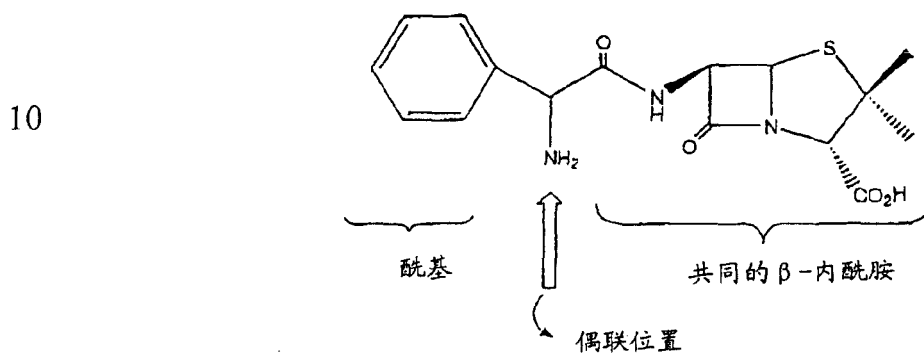
25 本发明描述了新的半抗原(氨基青霉素衍生物)在青霉素的 D- $\alpha$ -氨基乙  
酰氨基上的 $\alpha$ -氨基处与赋予抗原性(antigenicity-conferring)的载体物质发生  
的偶联作用,产生免疫原。本发明还描述了如何将针对这种免疫原产生的  
抗体用于开发可用来检测奶和肉等中 $\beta$ -内酰胺抗生素的存在的通用分析方  
法(assay)。

30

## 发明详述

在第一方面，本发明提供了包括 6-[D- $\alpha$ -氨基乙酰氨基]青霉素衍生物的半抗原，所述青霉素衍生物在  $\alpha$ -氨基上与取代或未取代的苯基二醛 (phenyldicarbaldehyde) 交联，其中苯基二醛选自取代或未取代的邻苯二醛、  
5 取代或未取代的间苯二醛和取代或未取代的对苯二醛。

代表性的 6-[D- $\alpha$ -氨基乙酰氨基]青霉素衍生物具有下式结构，其中偶联位置如箭头所示：



苯基二醛优选为取代或未取代的对苯二醛，最优选为未取代的对苯二醛。适宜的取代包括在对位和邻位进行醛、硫代异氰酸酯和 N-羟基琥珀酰亚胺官能基的加成。

在适宜的溶剂，例如二甲基甲酰胺和二甲基亚砷中，取代或未取代的苯基二醛与 6-[D- $\alpha$ -氨基乙酰氨基]青霉素衍生物反应可制得半抗原。

20 在另一方面，本发明涉及包括与赋予抗原性的载体物质结合的本发明的半抗原的免疫原。所述载体物质优选为蛋白质、蛋白质片段、合成的多肽或半合成的多肽。

在另一方面，本发明涉及抗(raised against)本发明的免疫原的抗体，该抗体可与完整的  $\beta$ -内酰胺环中的至少一种结构性抗原决定部位(epitope)结合。  
25 所述抗体优选固定在支持底物(backing substrate)上。

本发明还提供制备所述抗体的方法，该方法包括下列步骤：经重复给予本发明的免疫原使动物免疫(immunise)，所述动物优选为脊椎动物、最优选为哺乳动物；从免疫动物中收集所形成的血清抗体。优选地，该方法还包括将所述血清抗体固定到支持底物上，所述底物优选为固体载体(solid support)，  
30 最优选为聚苯乙烯固体载体。所述抗体优选为多克隆抗体。所述

抗体也可是单克隆抗体。

在另一方面，本发明包括包含本发明半抗原的偶联物，其中半抗原与可检测到的标记物共价结合。优选地，所述标记物选自酶、发光物质、放射性物质或其混合物。优选地，所述标记物为酶，优选为过氧化物酶，最  
5 优选为辣根过氧化物酶(HRP)。或者或另外地，发光物质可以是生物发光、化学发光或荧光物质。

在另一方面，本发明包括检测或定量样品中 $\beta$ -内酰胺青霉素的方法，该方法包括将样品与本发明的偶联物或其混合物和本发明抗体或其混合物接触；检测或定量结合的偶联物；从校准曲线中推出样品中 $\beta$ -内酰胺青霉  
10 素的存在及含量。

所述抗体优选为多克隆抗体。

在另一方面，本发明包括用于检测或定量 $\beta$ -内酰胺青霉素的试剂盒，该试剂盒包括本发明的偶联物或其混合物，以及本发明的抗体或其混合物。所述试剂盒可任选地包括检测或定量样品中 $\beta$ -内酰胺青霉素的偶联物和抗  
15 体的使用说明书。

优选地，所述样品为溶液形式，如生物流体，包括奶；或者细胞组织的切片物(cutting)，例如肉。

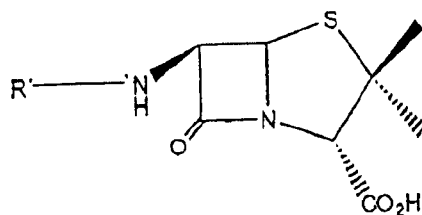
在本发明的方法和试剂盒中，可在 $\alpha$ -氨基位置上进行交联的（免疫原和偶联物）各自的交联剂可以相同或不同。

在另一方面，本发明涉及本发明的偶联物或其混合物和本发明的抗体或其混合物在测试样品如肉和奶，用于检测或定量 $\beta$ -内酰胺青霉素中的用途。  
20

本发明涉及新的半抗原，它能与具有抗原性的常规载体物质偶合制得新颖的免疫原。然后将所得的免疫原给予动物，优选为脊椎动物宿主，最  
25 优选为哺乳动物宿主，以诱发生成期望的多克隆抗血清，该抗血清可用来开发出以偶联物(半抗原-标记物)或其混合物为检测试剂的检测 $\beta$ -内酰胺青霉素的通用免疫分析法。

下表中总结了氨苄青霉素和其它 $\beta$ -内酰胺青霉素的化学结构，其通式如下：

30



5

表1  $\beta$ -内酰胺青霉素的化学结构

青霉素	R
青霉素 G	PhCH <sub>2</sub> CO
青霉素 V	PhOCH <sub>2</sub> CO
氨苄青霉素	D-PhCH(NH <sub>2</sub> )CO
羟基氨苄青霉素	D-(p-羟基)PhCH(NH <sub>2</sub> )CO
苯唑青霉素	5-甲基-3-苯基-4-异恶唑基-羧基
邻氯青霉素	5-甲基-3-(O-氯苯基)-4-异恶唑基-羧基
双氯青霉素	5-甲基-3-(O,O'-二氯苯基)-4-异恶唑基-羧基
6-氨基青霉烷酸	H

本发明的目的是制备对 $\beta$ -内酰胺青霉素基团的整个均有特异性的抗体。为达到这种广谱特异性，可用双官能交联剂如取代或未取代的苯基二醛，优选为取代或未取代的对苯二醛，其中未取代的对苯二醛如附图1所示，通过氨基，对氨苄青霉素进行衍生化处理。在衍生化期间保存氨苄青霉素的 $\beta$ -内酰胺环，这样以确保保留青霉素共有的抗原决定部位。

尽管本发明的半抗原(氨苄青霉素衍生物)可提供确定的结构性抗原决定部位，但是它本身并不具备免疫原性，因此必须要偶联到适宜的赋予抗原性的载体物质上，这样所形成的免疫原才会在注射到宿主动物体内后诱发免疫应答。适宜的赋予抗原性的载体物质包括蛋白或蛋白片段如白蛋白、血清蛋白例如球蛋白、目镜蛋白(ocular lens protein)和脂蛋白。示例性的蛋白载体包括牛血清白蛋白、卵清蛋白(egg ovalbumin)、牛丙种球蛋白(bovine gamma globulin)、甲状腺素结合球蛋白、锁眼形血蓝蛋白(keyhole limpet haemocyanin)等。或者，也可采用具有足够数量的可利用胺基的合成聚氨基

酸, 例如赖氨酸, 也可以是具有反应性官能团的其他合成或天然聚合物。具体地说, 碳水化合物(carbohydrate)、酵母或多糖均可与半抗原偶联而形成本发明的免疫原。

半抗原(氨苄青霉素衍生物)也可与标记物偶联而形成可用于免疫分析5 的检测试剂, 所述标记物如酶(例如辣根过氧化物酶)、荧光物质或放射性物质。例如, 荧光物质可以是荧光素或其衍生物的一价残基。

按附图 1 所示的反应路线 1, 制备半抗原及其与载体物质或标记物(例如酶或其他标记)的偶联物。因此, 例如, 室温下将氨苄青霉素与对苯二醛在二甲基甲酰胺中反应 18 小时, 可得到 Schiff 碱中间体。在 pH 4-5 的醋酸10 盐缓冲液中, 该中间体与载体物质(例如牛血清白蛋白)或标记物(例如酶或其他标记)反应, 然后用例如氰硼氢化钠(sodium cyanoborohydride)还原 Schiff 碱, 可分别得到本发明的免疫原和本发明的偶联物。

为了确定半抗原是否与载体物质形成了足够的偶联, 可在进行免疫之前, 采用基体辅助的 UV 激光解吸/电离质谱(MALDI MS)对每一免疫原进行15 评估。就优选的载体物质, 牛血清白蛋白, 而言, 优选每载体分子最少 6 个半抗原分子。

为了形成多克隆的抗血清, 将免疫原与 Freund 佐剂(Freund's Adjuvant)混和, 然后将所得混合物注入宿主动物如兔、羊、小鼠、豚鼠或马体内。进一步注射(促升(boost))后, 取血清样品供抗体滴定评估。当达到最佳滴定20 时, 将宿主动物体放血以产生适宜量的特异性抗血清。所需的抗体纯化程度取决于具体的应用目的。对于大多数应用而言, 根本无需进行纯化, 但是对于其他情况, 如抗体需固定在固体载体上的情况, 则需要进行纯化步骤来除去不需要的物质并减少或除去非特异性结合。

对氨苄青霉素产生的抗体, 在生化分析中可用作检测生物流体如奶中25 和食品如肉中是否存在  $\beta$ -内酰胺青霉素的试剂。

#### 附图简述

图 1 为反应路线 1, 它表示的是制备本发明的半抗原, 接着与载体物质或标记物偶合, 形成本发明免疫原或本发明偶联物的总反应路线。

30 图 2 为微量滴定盘中进行的竞争性 ELISA 滴定法示意图。

图 3 为竞争性 ELISA 的校准曲线。

图 4 为采用每种  $\beta$ -内酰胺青霉素作为标准品(standard)在 ELISA 中所得到的校准曲线。

5

#### 实施例 1

##### 制备半抗原

在 20°C 通氮下，将 183mg(1.364 mmole)对苯二醛加到在 10 ml 二甲基甲酰胺中的 500mg(1.24 mmole)氨苄青霉素三水合物溶液中。混合物避光并在室温下搅拌 24 小时。为确定反应完全，可进行薄层色谱法(TLC)(80%氯仿，20%甲醇 v/v)分析，显示起始物质没有剩余，并且新斑点(spot)的极性比氨苄青霉素低。将制得的半抗原置于-20°C 下在氮气下贮藏(可稳定 1 年)。

#### 实施例 2

##### 制备免疫原(半抗原-牛血清白蛋白)

15 将实施例 1 制得的半抗原溶液滴加到 10ml 0.1M 醋酸钠缓冲液(pH 4.1)中的 200mg 牛血清白蛋白(BSA)溶液中。将混合物避光并在室温下搅拌 4 小时。加入 30mg 氰硼氢化钠，对 Schiff 碱进行还原处理。将混合物搅拌 90 分钟，并加入 5mg 氰硼氢化钠。再搅拌 10 分钟后，4°C 下用磷酸盐缓冲的盐水(pH7.2)对混合物进行透析(dialyse)24 小时(3 个转换)。用 MALDI MS  
20 测量与 BSA 偶合的半抗原量，结果表明半抗原分子与 BSA 分子的偶联比例为 6.3:1。

#### 实施例 3

##### 制备偶联物(半抗原-HRP)

25 按类似于制备免疫原的方法，进行实施例 1 制得的半抗原与 HRP 的偶联。取实施例 1 制得的半抗原溶液 40 $\mu$ l，加到 2ml 0.1M 醋酸钠缓冲液(pH4-5)中的 20mg HRP(辣根过氧化物酶)中。混合物避光并在室温下搅拌 4 小时。加入氰硼氢化钠(0.7mg)后，将混合物搅拌 90 分钟。用 2 个 PD-10 柱(Pharmacia Biotech)对所得偶联物进行纯化，避光并于 2-8°C 下用双重去离子水透析过夜。

30

#### 实施例 4

制备对抗实施例 2 的免疫原而产生的抗体

用 Freund 完全佐剂(FCA)配制实施例 2 的免疫原的水溶液, 得到在 50%(v/v)FCA 中的含有 2mg/ml 免疫原的乳液。用该乳液对 3 只羊进行免疫, 在每只动物腹肋上的 4 个位置分别皮下注射 0.25ml 溶液。后继免疫(促升)采用经 50%(v/v) Freund 不完全佐剂(FIA)乳化的 1mg/ml 免疫原, 并以同样方式隔月给予动物, 共 1 年。在每次促升后的 7-14 天采取血样。对每一样品进行处理以产生抗血清, 它再经辛酸和硫酸铵沉淀纯化而得到免疫球蛋白 G(IgG)部分。按下述方法, 采用竞争性 ELISA 微量滴定盘分析法(microtiter plate assay)对 IgG 部分进行评估。

10

### 实施例 5

开发竞争性 ELISA 法

进行检测板滴定(checkerboard titration), 测定最佳捕捉抗体和偶联物(氨苄青霉素-HRP)浓度。采用连续稀释法, 在 10mM 的 Tris(pH8.5)中配制每一待测抗血清的 IgG 部分(按实施例 4 制备)。用上述稀释液涂覆(coat)增强结合的 96 孔聚苯乙烯微量滴定盘的孔(如图 2 所示), 将滴定盘(125 $\mu$ l/孔)置于 37 $^{\circ}$ C 下保温 2 小时。滴定盘用 Tris 缓冲的盐水(pH7.4, 含有 Tween<sup>TM</sup> 20)(TBST)洗涤 4 次并轻打干燥(tapped dry)。将 TBST 中的 50 $\mu$ l 的 10ng/ml 氨苄青霉素溶液(在分析范围之内)加到适当的孔中(图 2)。将 50 $\mu$ l TBST 加到剩余(对照)孔中。在含有 EDTA、D-甘露醇、蔗糖、硫汞撒(thimerosal)和 BSA 的 Tris 缓冲液中(pH7.2)配制偶联物(氨苄青霉素-HRP)的连续稀释液, 然后将 75 $\mu$ l 的每种稀释液加到孔中(如图 2 所示)。将滴定盘于 37 $^{\circ}$ C 下保温 2 小时。用 TBST 在 10 分钟内洗涤 6 次, 除去过量的没结合的偶联物。向滴定盘的每一孔中加入 125 $\mu$ l 四甲基联苯胺(TMB)底物溶液, 然后将滴定盘于室温、黑暗条件下保温 15-20 分钟。向每孔中加入 125 $\mu$ l 0.2M 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>以终止反应。然后用微量滴定盘读数器测量 450nm 处的吸光度。捕捉抗体的 1/1000 稀释液(dilution)和偶联物的 1/15,000 稀释液, 产生了可接受的最高吸光度 2.15, 而且在 0-10ng/ml 抗体浓度之间的吸光度明显降低了 80%。

用如上述的在 Tris(pH8.5)中的抗-氨苄青霉素抗血清的 IgG 部分 1/1000 的最佳涂覆稀释液涂覆微量滴定盘。在 TBST 中配制氨苄青霉素(钠盐)的标准溶液, 并在下列浓度下应用 0, 1, 5, 10, 50, 100, 200, 500ng/ml。由所产生

30

的数据得到的灵敏的校准曲线如图 3 所示, 其中 B 为 x ng/ml 氨苄青霉素于 450nm 测定的吸光度值,  $B_0$  为 0 ng/ml 氨苄青霉素于 450nm 的吸光度值。

#### 实施例 6

氨苄青霉素免疫分析法与每种  $\beta$ -内酰胺青霉素的交叉反应性

- 5 在 TBST 中配制苄基青霉素(青霉素 G-PenG)、羟氨苄青霉素(Amox)、邻氯青霉素(Clox)、双氯青霉素(Diclox)和苯唑青霉素(Oxa)的标准溶液, 浓度为 0, 1, 5, 10, 50, 100, 200 和 500ng/ml。在氨苄青霉素免疫分析中, 使用每种  $\beta$ -内酰胺青霉素标准品制得校准曲线(图 4), 用于测定免疫分析与每种青霉素的交叉反应性。结果见表 2, 按下式计算交叉反应性:

$$10 \quad \%CR = IC50_{\text{氨苄青霉素}} / IC50_{\text{青霉素}} \times 100$$

其中: %CR 表示百分交叉反应性,

$IC50_{\text{氨苄青霉素}}$  为引起 50% 吸收信号位移(displacement)时氨苄青霉素的浓度,  $IC50_{\text{青霉素}}$  为评估 %CR 时引起 50% 信号位移时  $\beta$ -内酰胺青霉素的浓度。

- 15 氨苄青霉素免疫分析法与每种  $\beta$ -内酰胺青霉素存在高度的交叉反应性(表 2)。高度的交叉反应性表示交叉反应性大于 35%, 相对于氨苄青霉素的 100% 而言。该免疫分析法最高的特异性为氨苄青霉素(100%CR), 羟氨苄青霉素(87%CR)和苄基青霉素(benzylpenicillin) (72%CR)。由于奶中羟氨苄青霉素、氨苄青霉素和苄基青霉素的最高建议浓度(MRL)为 4 $\mu$ g/kg, 而苯唑青霉素、邻氯青霉素和双氯青霉素的 MRL 为 30 $\mu$ g/kg, 因此上述测定的
- 20 每种  $\beta$ -内酰胺青霉素的  $IC50$  值显示: 所述 ELISA 适于用作依照 EC 规则 2377/90 的  $\beta$ -内酰胺抗生素的通用免疫分析法。

表 2: 氨苄青霉素免疫分析法与  $\beta$ -内酰胺青霉素的交叉反应性

$\beta$ -内酰胺	分析(assay)1		分析 2		分析 3		平均结果		MRLs $\mu$ g/kg
	IC50 ng/ml	%CR	IC50 ng/ml	%CR	IC50 ng/ml	%CR	IC50 ng/ml	%CR	
氨苄青霉素	1.7	100	2.5	100	2.5	100	2.2	100	4
羟氨苄青霉素	1.8	94	3.0	83	3.0	83	2.6	87	4
青霉素 G	2.7	63	3.2	78	3.4	74	3.1	72	4
苯唑青霉素	4.0	42.5	7.0	36	6.6	38	5.9	39	30
邻氯青霉素	3.4	50	5.8	43	5.8	43	5	45	30
双氯青霉素	3.8	45	6.0	42	4.9	51	4.9	46	30

### 实施例 7

采用通用免疫分析法定量分析奶中的  $\beta$ -内酰胺抗生素

采用标准抗微生物方法，检测多种奶样品中是否存在  $\beta$ -内酰胺抗生素。采用本发明 ELISA 对这些标示值的样品进行分析。按实施例 5 方法涂覆微量滴定盘并配制试剂。如下适用免疫分析法。用蒸馏水溶解脱脂奶粉，制得 1% 的奶缓冲液(pH7.4)，取 25 $\mu$ l 该缓冲液加到滴定盘孔中。加入奶缓冲液后，加载氨苄青霉素标准品(每孔 25 $\mu$ l)，接下来加入奶样品(每孔 25 $\mu$ l)。标准品和样品均制备双份。然后每孔加入 75 $\mu$ l 偶联物(氨苄青霉素-HRP)。将微量滴定盘置于 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时，使反应完全。待反应完全后，按实施例 5 的方法洗涤滴定盘并显色(develop)。分析结果如表 3 所示，其中给出了本发明所述的  $\beta$ -内酰胺 ELISA 测试的多种奶样品的计算浓度。所述的  $\beta$ -内酰胺 ELISA 用于检测已知不含  $\beta$ -内酰胺的奶样品(样品 1-6)以及已知含有  $\beta$ -内酰胺的奶样品(样品 7 和 8)。ELISA 结果确认样品 1-6 中  $\beta$ -内酰胺抗生素的含量为阴性，而样品 7 和 8 的结果为阳性。

示于表 3 中的 ELISA 结果证实，该免疫分析方法可成功地用于检测牛奶样品中的  $\beta$ -内酰胺。已知阴性的样品经本发明 ELISA 确认为阴性，而已知阴性的样品经本发明 ELISA 确认为阴性。

表 3:

奶样品	吸光度	CV%	计算浓度
1	1.906	2.2	阴性(Neg)
2	1.826	1.7	阴性
3	2.083	1.6	阴性
4	1.857	0.1	阴性
5	1.754	3.1	阴性
6	1.719	0.9	阴性
7	0.718	9.0	126.19
8	0.914	7.8	66.79

---

### 参考书目

- Faghihi Shirazi M., Hung TV., Womersley DM. 1991. Polyclonal antibodies reactive to some Beta-Lactam antibiotics. Austrelian Journal of Dairy Technology,46(2),88-90.
- 5 De Haan P., de Jonge A.J.R, Verbrugge T. and Boorsma D.M., 1985. Three epitope specific monoclonal antibodies against the hapten penicillin. Int. Arch. Allergy Appl Immun. 76: 42-46.
- De Leuw P., Kapa G. and Petz M.,1997. Production and Characterisation of Multianalyte Antibodies against penicillins in egg yolk. J. of AOAC International  
10 80 (6): 1220-8.
- Nagakura N., Souma S., Shimizu T., Yanagihara Y., 1991. Anti-ampicillin monoclonal antibodies and their cross-reactivities to various  $\beta$ -lactams. J. of Antimicrobial Chemotherapy, 28: 357-368.
- Usleber, E., Lorber, M. Straka M., Terplan G., Martlbauer E., 1994. Enzyme  
15 Immunoassay for the Detection of Isoxazolyl Penicillin Antibiotics in Milk. Analyst, 119, 2765-2768.

反应路线 1

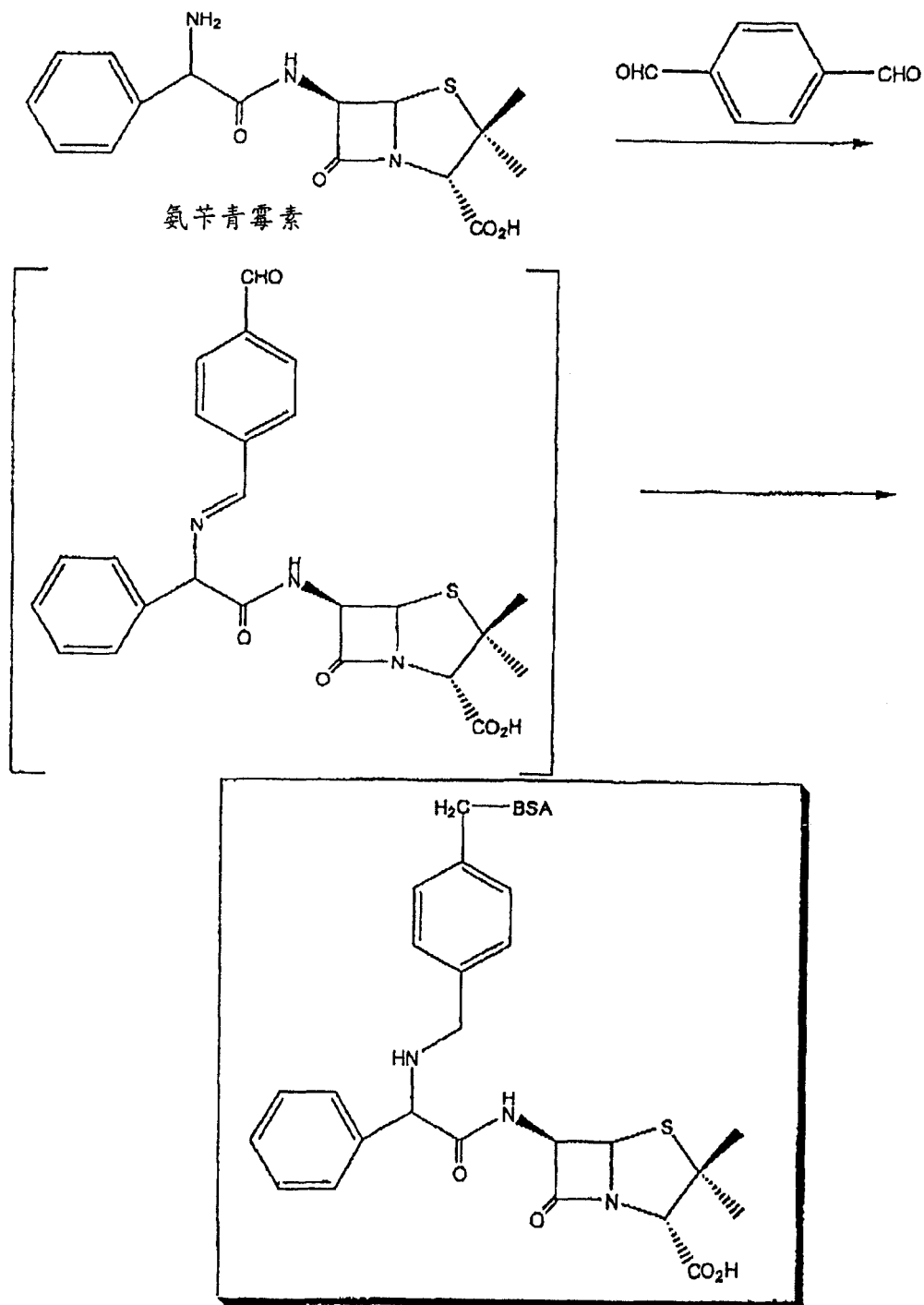


图 1

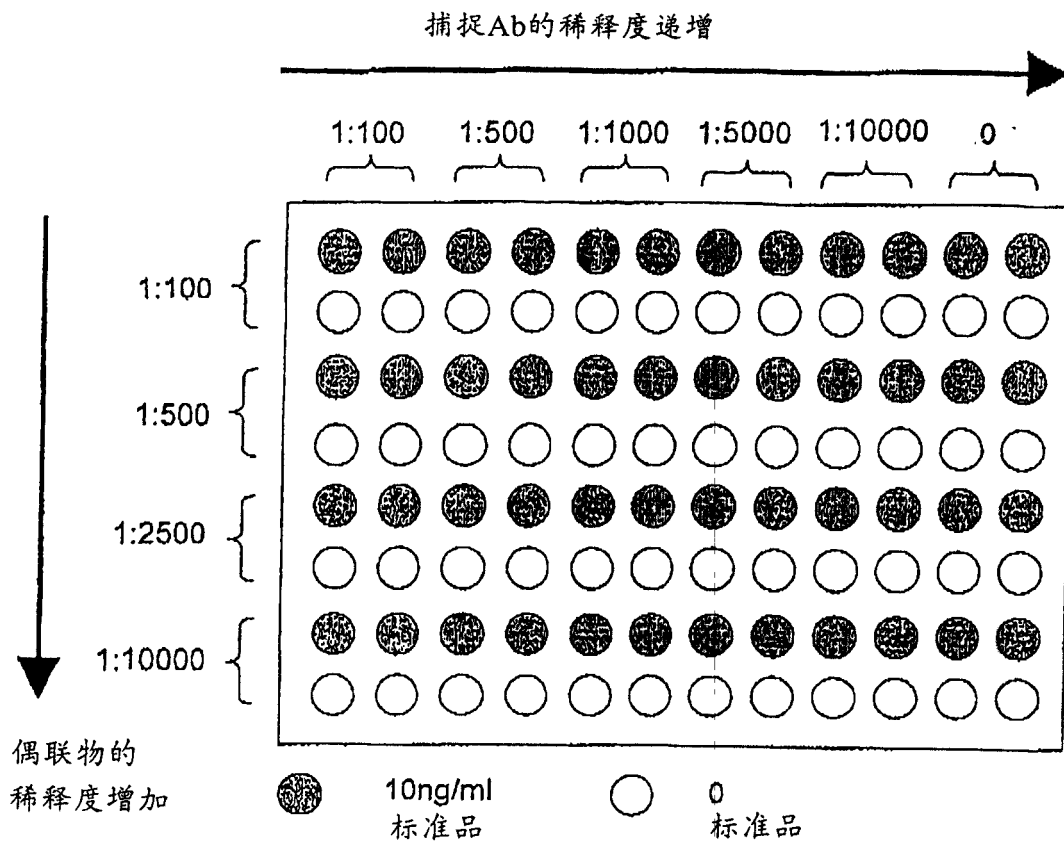


图 2

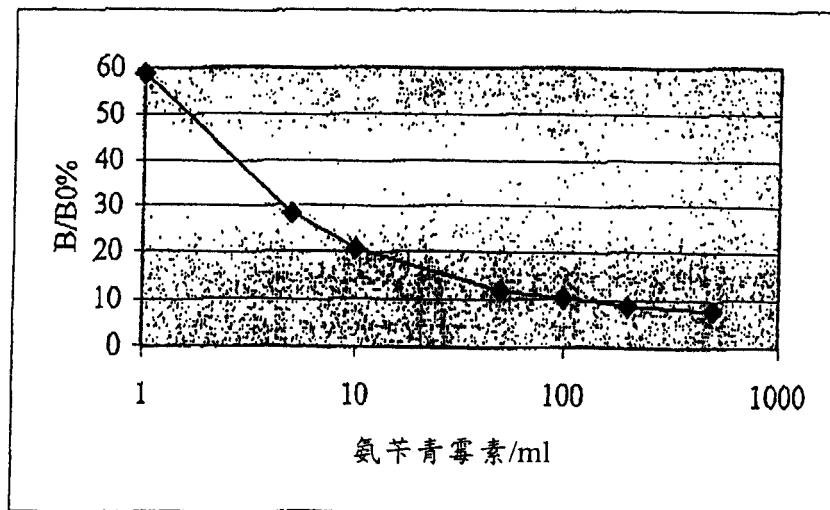


图 3

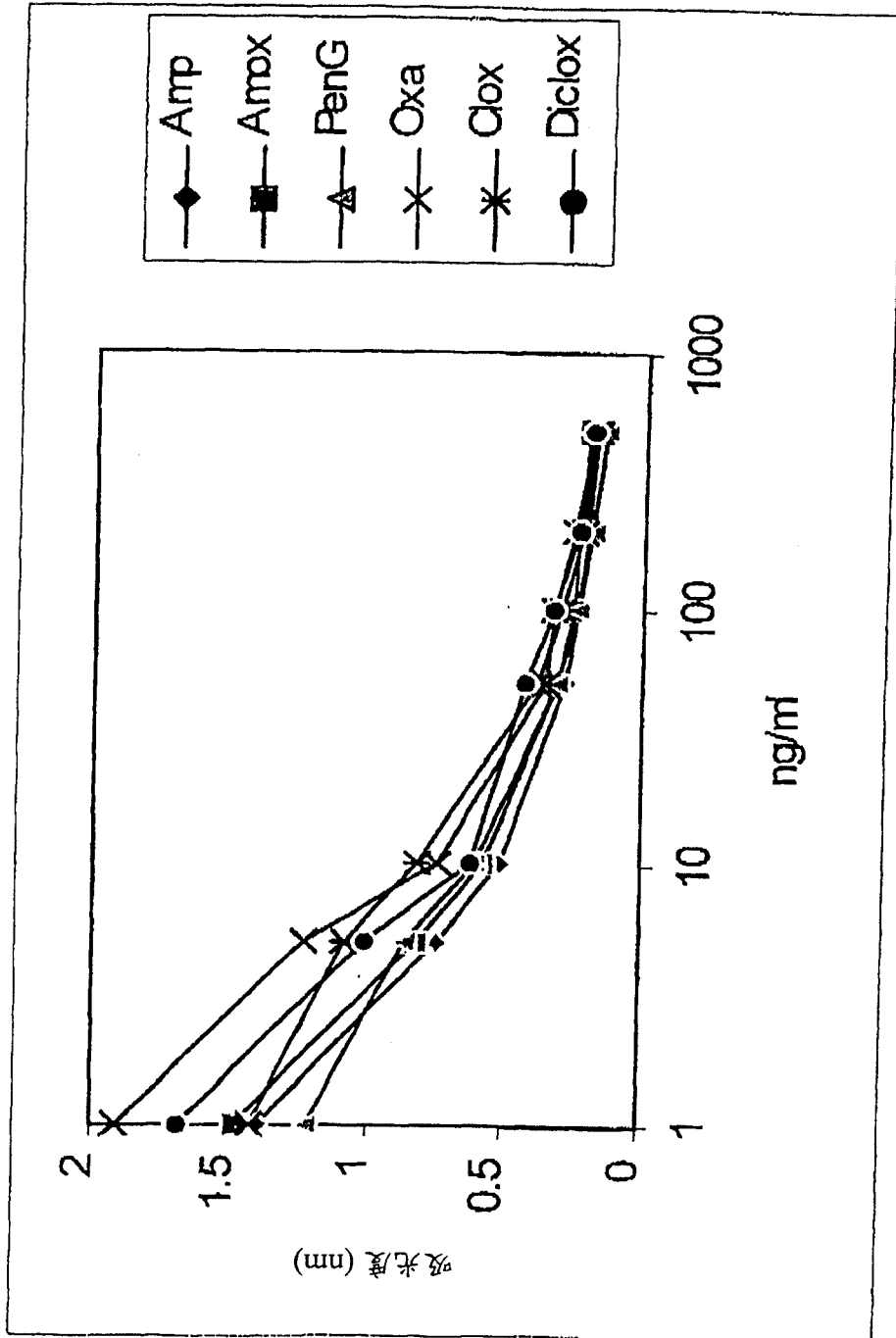


图 4

专利名称(译)	用于检测和定量β - 内酰胺青霉素的方法和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1223596C</a>	公开(公告)日	2005-10-19
申请号	CN02127338.3	申请日	2002-08-02
[标]发明人	罗伯特 麦康奈尔 埃尔O本奇克 斯蒂芬P菲茨杰拉德 约翰V拉蒙特		
发明人	罗伯特· I· 麦康奈尔 埃尔· O· 本奇克 斯蒂芬· P· 菲茨杰拉德 约翰· V· 拉蒙特		
IPC分类号	G01N33/53 C07D499/00 C07D499/40 C07K16/14 C07K16/44 G01N33/02 G01N33/536 G01N33/94 C07D499/64 G01N33/532		
CPC分类号	C07D499/00 G01N2415/00 C07K16/44 G01N33/9446		
代理人(译)	宋莉		
优先权	2001202941 2001-08-02 EP		
其他公开文献	CN1405563A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供包括6-[D-α-氨基乙酰氨基]青霉素衍生物的半抗原，所述青霉素衍生物在α-氨基上与取代或未取代的苯基二醛交联。另外，本发明提供包括与赋予抗原性的载体物质结合的前述半抗原的免疫原，包括与标记物结合的前述半抗原的偶联物，以及抗前述免疫原的抗体，该抗体能与完整的β-内酰胺环中的至少一种结构性抗原决定部位结合。本发明还提供用于检测或定量样品中β-内酰胺抗生素的方法和试剂盒，以及前述偶联物和前述抗体在检测或定量β-内酰胺抗生素中的用途。本发明对主要的第一代β-内酰胺具有广谱特异性，并可用于检测奶和肉等中残留的β-内酰胺抗生素的存在。

